

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
11. Mai 2006 (11.05.2006)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2006/048164 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:
C12Q 1/68 (2006.01) G01N 33/542 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2005/011477

(22) Internationales Anmeldedatum:
26. Oktober 2005 (26.10.2005)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2004 053 918
5. November 2004 (05.11.2004) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): ANALYTICON BIOTECHNOLOGIES AG
[DE/DE]; Am Mühlenberg 10, 35104 Lichtenfels (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): OBERSTRASS, Jür-
gen [DE/DE]; Schöne Aussicht 30, 34317 Habichtswald
(DE). SCHAPER, Reinhard [DE/DE]; Upländer Str. 2,
34497 Korbach-Rhena (DE).

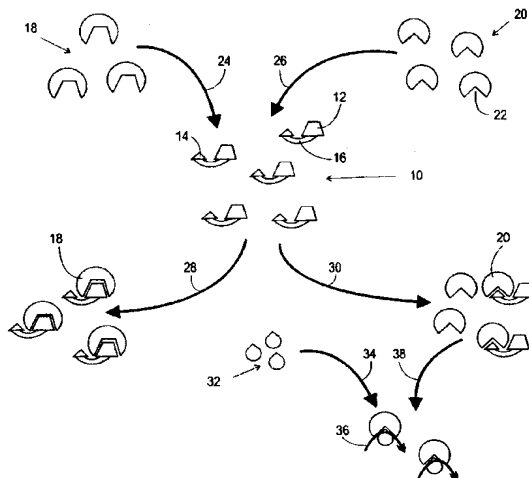
(74) Anwalt: SCHNEIDER, Peter; PAe Fiedler, Ostermann &
Schneider, Obere Karspüle 41, 37073 Göttingen (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,
AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY,
MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO,
NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: APTAMER-BASED TEST SYSTEM

(54) Bezeichnung: APTAMERBASIERTES TESTSYSTEM



(57) Abstract: The invention relates to an aptamer-based test system and method for detecting a species of analyte (18) in a test liquid (58) by detecting a signal that is dependent on a detection structure (20). Said system comprises a species of oligofunctional reaction units (10), which respectively comprise a first aptamer (12) that can bond to an analyte (18) and at least one second aptamer (14) that is linked to the first aptamer (12) and can bond to bonding areas (22) of the detection structure (20). The first aptamer (12) and the second aptamer (14) of each reaction unit (10) are linked to one another in such a way that the bonding of the first aptamer (12) of a reaction unit (10) to the analyte (18) inhibits the simultaneous bonding of the second aptamer (14) of the same reaction unit (10) to a bonding area (22) of the detection structure (20) and the bonding of the second aptamer (14) of a reaction unit (10) to a bonding area (22) of the detection structure (20) inhibits a simultaneous bonding of the first aptamer (12) of the same reaction unit (10) to an analyte (18).

(57) Zusammenfassung: Aptamerbasiertes Testsystem und Verfahren zum Nachweis einer Spezies von Analyten (18) in einer Testflüssigkeit (58) unter Detektion eines von einer Detektionsstruktur (20) abhängigen Signals, umfassend eine Spezies oligofunktionaler Reaktionseinheiten (10), die jeweils wenigstens ein mit einem Analyten (18) bindungsfähiges,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 2006/048164 A1



SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC,

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

erstes Aptamer (12) und wenigstens ein mit dem ersten Aptamer (12) verknüpftes und mit Bindungsbereichen (22) der Detektionsstruktur (20) bindungsfähiges, zweites Aptamer (14) aufweisen, wobei das erste Aptamer (12) und das zweite Aptamer (14) jeder Reaktionseinheit (10) derart miteinander verknüpft sind, dass ein Binden des ersten Aptamers (12) einer Reaktionseinheit (10) mit einem Analyten (18) ein simultanes Binden des zweiten Aptamers (14) derselben Reaktionseinheit (10) mit einem Bindungsbereich (22) der Detektionsstruktur (20) inhibiert und ein Binden des zweiten Aptamers (14) einer Reaktionseinheit (10) mit einem Bindungsbereich (22) der Detektionsstruktur (20) ein simultanes Binden des ersten Aptamers (12) derselben Reaktionseinheit (10) mit einem Analyten (18) inhibiert.

Aptamerbasiertes Testsystem

Beschreibung

Die Erfindung bezieht sich auf ein aptamerbasiertes Testsystem zum Nachweis einer Spezies von Analyten in einer Testflüssigkeit unter Detektion eines von einer Detektionsstruktur abhängigen Signals, umfassend eine Spezies oligofunktionaler Reaktionseinheiten, die jeweils wenigstens ein mit einem Analyten bindungsfähiges, erstes Aptamer und wenigstens ein mit dem ersten Aptamer verknüpftes und mit Bindungsbereichen der Detektionsstruktur bindungsfähiges, zweites Aptamer aufweisen, wobei das erste Aptamer und das zweite Aptamer jeder Reaktionseinheit derart miteinander verknüpft sind, dass ein Binden des ersten Aptamers einer Reaktionseinheit mit einem Analyten ein simultanes Binden des zweiten Aptamers derselben Reaktionseinheit mit einem Bindungsbereich der Detektionsstruktur inhibiert.

Die Erfindung bezieht sich weiter auf ein Testverfahren zum Nachweis einer Spezies von Analyten in einer Testflüssigkeit unter Detektion eines von einer Detektionsstruktur abhängigen Signals, wobei eine Spezies oligofunktionaler Reaktionseinheiten, die jeweils wenigstens ein mit einem Analyten bindungsfähiges, erstes Aptamer und wenigstens ein mit dem ersten Aptamer verknüpftes und mit Bindungsbereichen der Detektionsstruktur bindungsfähiges, zweites Aptamer aufweisen, über Bindungen erster Aptamere mit Analyten und

über Bindungen zweiter Aptamere mit Bindungsbereichen der Detektionsstruktur binden, wobei das erste Aptamer und das zweite Aptamer jeder Reaktionseinheit derart miteinander verknüpft sind, dass ein Binden des ersten Aptamers einer Reaktionseinheit mit einem Analyten ein simultanes Binden des zweiten Aptamers derselben Reaktionseinheit mit einem Bindungsbereich der Detektionsstruktur inhibiert.

Ein derartiges Testsystem und ein derartiges Verfahren sind bekannt aus WO 99/60169 A1.

Unter einem Aptamer versteht man eine funktionale Oligonukleotideinheit. Es ist bekannt, dass Oligonukleotide, d.h. DNA- oder RNA-Sequenzen aus wenigen Basen (bis zu wenigen 100 Basen) zu 3-dimensionalen Strukturen falten, die von Sequenz, Umgebungsparametern, Bindungsumfeld etc. abhängig sein können. Je nach Ausprägung der 3-dimensionalen Struktur können solche Aptamere mit korrespondierenden Bereichen von Zielmolekülen in Wechselwirkung treten, insbesondere binden. Als Zielmoleküle kommen prinzipiell sämtliche komplexeren organischen Verbindungen infrage, vor allem Biomolekülgruppen, wie beispielsweise Proteine, Nukleinsäuren, Haptene, Hormone, Drogen etc.. Korrespondiert dabei das Aptamer mit Bindungsbereichen des Zielmoleküls, die für das Zielmolekül einzigartig sind oder lediglich bei einer kleinen Gruppe von Zielmolekülen auftreten, kann die Bindung zwischen Aptamer und Zielmolekül spezifisch oder zumindest selektiv sein.

Durch ihre Bindungsfähigkeit an bestimmte Bereiche ihrer Zielmoleküle können Aptamere zur gezielten Beeinflussung molekularer Funktionen genutzt werden. Beispielsweise lässt sich die enzymatische Funktion bestimmter Proteine durch

Aptamere regulieren, indem beispielsweise durch die Aptamer-Bindung eine Umfaltung des Proteins initiiert wird oder indem das katalytische Zentrum eines Enzyms sterisch inhibiert wird. Beispiele für derartige, regulatorische Wirkungen von Aptameren sind bekannt aus „Isozyme-specific Inhibition of Protein Kinase C by RNA-Aptameres“ von Conrad R.; Keranen, L.M.; Allington, A.D.; Newton, A.C. in *The Journal of Biological Chemistry*, Bd. 269, Nr. 51, Seite 32051-32054 (1994) sowie „Controlling Protein Activity with Ligand-Regulated RNA Aptamers“ von Vuyisich, M.; Beal, P.A. in *Chemistry & Biology*, Bd. 9, Seite 907-913 (2002).

Da sich die speziellen Bindungseigenschaften derzeit schlecht aus der reinen Nukleinsäuresequenz vorhersagen lassen, werden Aptamere mit gewünschten Eigenschaften üblicherweise in Selektionsverfahren, wie beispielsweise dem sogenannten SELEX-Verfahren für RNA-Aptamere, selektioniert. Ist die Sequenz eines Aptamers mit den gewünschten Eigenschaften bekannt, ist es jedoch auch möglich, ein solches Aptamer mit herkömmlichen Methoden der Nukleinsäure-Synthese und / oder -Vervielfältigung (z.B. PCR) zu repräsentieren.

Aus der US 6,177,555 B1 ist es bekannt, sich die selektiven Bindungseigenschaften von Aptameren im Rahmen von Testsystemen zum Nachweis spezieller Analyten, für welche die Aptamere selektiv sind, zu Nutze zu machen. In der genannten Druckschrift wird ein Testsystem offenbart, bei welchem eine Aptamerspezies mit einer in einer Testlösung enthaltenen Spezies von Analyten zur Wechselwirkung gebracht wird. Die einzelnen Aptamere binden dabei jeweils entweder an einen Analyten oder an ein ebenfalls in dem Testsystem vorhandenes sogenanntes Fluoreszenz-Beacon, eine Oligonukleotidstruktur mit zwei Fluorophoren, die ein sogenanntes FRET-Paar

(Fluorezenz-Resonanz-Energie-Transfer) bilden. Insbesondere ist der Abstand der FRET-Partner so klein gewählt, dass es im ungebundenen Beacon zu einer effizienten Löschung der Donor-Fluoreszenz kommt. Bei Bindung des Beacons mit dem Aptamer wird die Beacon-Sequenz in die Aptamer-Sequenz integriert. Hierdurch kommt es zu einer Umfaltung des neuen Gesamtmoleküls und insbesondere zu einer Vergrößerung des Abstandes der FRET-Partner, was zu einer Aufhebung der Löschung der Donor-Fluoreszenz führt. Gleichzeitig verliert das Aptamer durch die Umfaltung seine Bindungsfähigkeit mit einem Analyten. Die Donor-Fluoreszenz kann daher als Maß für die Menge Beacon-gebundener, d.h. nicht durch Analyten gebundener Aptamere, und somit indirekt für die Menge der in der Testflüssigkeit vorliegenden Analyten dienen.

Nachteilig an diesem bekannten Testsystem ist, dass Aptamer, Beacon und Analyt jeweils in einzigartiger Weise aufeinander abgestimmt sein müssen. Die Entwicklung neuer Testsysteme für neue Analyten ist daher sehr aufwendig. Zudem erfordert die Messung von FRET-Effizienzen hochkomplexe und sehr teure Fluoreszenz-Messstationen, die das bekannte Testverfahren für Routinemessungen mit hohem Probendurchsatz ungeeignet machen.

Aus der WO 02/061079 A2 ist ein Testsystem bekannt, bei dem die oben genannten oligofunktionalen Reaktionseinheiten als Crosslink-Strukturen mit zwei aptameren Funktionsköpfen zu Kopplung eines Analyten mit einer detektierbaren Einheit ausgestaltet sind. Hierzu wird ein für den Analyten spezifisches Aptamer mittels einer als „Adaptamer“ bezeichneten Koppereinheit mit einem zweiten Aptamer gekoppelt, welches in der Lage ist, Streptavidin zu binden. Bekanntermaßen kann Streptavidin als Verbindungsglied zu biotinilierten, detektierbaren Einheiten, wie etwa

Fluoreszenz-Markern, Farbreaktionen auslösenden Enzymen, partikelförmigen Direktmarkierungen etc. verwendet werden. Das Prinzip des bekannten Testsystems beruht auf der direkten Markierung der Analyten durch aptamerhaltige Crosslink-Strukturen, die ihrerseits mit weiteren, detektierbaren Einheiten markiert oder markierbar sind.

Nachteilig bei diesem bekannten Testsystem ist die relative Insensitivität und mangelnde Flexibilität derartiger Direkttests, bei denen die Sensitivität der Messapparatur zur Detektion des Signals durch eine Mindest-Absolutmenge bzw. -Konzentration des Analyten beschränkt ist. Insbesondere sehr geringe Analytkonzentrationen sind mit solchen Direkttests nicht zuverlässig mess- oder detektierbar.

Auch aus der WO 01/57259 A1 ist ein Direkttest in Form eines aptamerbasiertes Signal-/Reporter-Testsystems bekannt. Dabei wird bei Bindung eines Liganden an ein Signal-Aptamer ein Signal in Form einer Konformationsänderung an ein kovalent gebundenes, nicht-aptamerisches Reportermolekül weitergegeben, welches in der Folge ein enzymatisches Signal erzeugt. Die Beeinflussungskette zwischen Signal- und Reportermolekül ist rein unidirektional vom Signal- zum Reportermolekül.

Ebenfalls einen Direkttest offenbart die gattungsbildende WO 99/60169 A1. Dabei wird versucht, den vorgenannten Nachteil dadurch zu überwinden, dass die Detektionsstruktur kovalent oder pseudoirreversibel mit der Reaktionseinheit, insbesondere dem ersten Aptamer, gebunden ist. Auf diese Weise wird ein Überschuss an freien (signalgebenden) Enzymen vermieden. Diese zusätzliche Kopplung ist jedoch mit erhöhtem Synthetisierungsaufwand und daher mit erhöhten Kosten

verbunden. Außerdem ist eine zusätzliche biomolekulare Bindung in der Regel mit einem Stabilitätsverlust des gebildeten Komplexes verbunden. Dies macht zusätzliche Aufreinigungsschritte bei der Herstellung erforderlich.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein gattungsgemäßes Testsystem bzw. ein gattungsgemäßes Testverfahren derart weiterzubilden, dass größere Flexibilität und Sensitivität beim Nachweis von Analyten erzielt wird.

Diese Aufgabe wird in Verbindung mit den Merkmalen des Oberbegriffs von Anspruch 1 dadurch gelöst, dass das erste Aptamer und das zweite Aptamer jeder Reaktionseinheit weiter derart miteinander verknüpft sind, dass ein Binden des zweiten Aptamers einer Reaktionseinheit mit einem Bindungsbereich der Detektionsstruktur ein simultanes Binden des ersten Aptamers derselben Reaktionseinheit mit einem Analyten inhibiert.

Diese Aufgabe wird weiter in Verbindung mit den Merkmalen des Oberbegriffs von Anspruch 28 dadurch gelöst, dass das erste Aptamer und das zweite Aptamer jeder Reaktionseinheit weiter derart miteinander verknüpft sind, dass ein Binden des zweiten Aptamers einer Reaktionseinheit mit einem Bindungsbereich der Detektionsstruktur ein simultanes Binden des ersten Aptamers derselben Reaktionseinheit mit einem Analyten inhibiert.

Die Merkmale und Vorteile des erfindungsgemäßen Testsystems und des erfindungsgemäßen Testverfahrens sowie besonders günstige Ausführungsformen beider, die Gegenstand der

abhängigen Ansprüche sind, werden nachfolgend gemeinsam beschrieben.

Ein wesentliches Merkmal der Erfindung ist, dass, im Gegensatz zum Stand der Technik, die oligofunktionale, insbesondere bifunktionale Reaktionseinheit nicht als Crosslink-Struktur sondern mit wenigstens paarweise exklusiv bindungsfähigen aptameren Funktionseinheiten ausgestaltet wird. Im Rahmen der nachfolgenden Beschreibung wird zum einfacheren Verständnis der Erfindung im Wesentlichen auf bifunktionale Reaktionseinheiten Bezug genommen. Es sei jedoch ausdrücklich angemerkt, dass das erfindungsgemäße Konzept auch auf Reaktionseinheiten mit mehr als zwei aptameren Funktionsköpfen anwendbar ist.

Durch exklusive Bindung der Reaktionseinheit entweder an einen Analyten oder an einen Bindungsbereich der Detektionsstruktur lassen sich die Vorteile, die mit der Verwendung von Aptameren verbunden sind, auch bei kompetitiven Tests nutzen. Kompetitive Tests sind jedoch insbesondere im Bereich kleiner Analytkonzentrationen deutlich sensitiver als Direkttests, da sich durch geeignete Auswahl der Konzentrationen der Reaktionspartner die messbaren Signale in einen für die verwendete Detektionsapparatur jeweils optimalen Intensitätsbereich transformieren lassen.

Zur Herstellung der Reaktionseinheiten zur Verwendung im Rahmen der Erfindung werden zunächst die benötigten Aptamere einzeln und nach bekannten Selektions- bzw. Syntheseverfahren hergestellt. Vorzugsweise erfolgt die Auswahl bzw. Synthese der Aptamere so, dass das Binden des ersten Aptamers mit dem Analyten und / oder das Binden des zweiten Aptamers mit dem

Bindungsbereich der Detektionsstruktur selektiv, insbesondere spezifisch ist.

Die Größe der Aptamere kann je nach Herstellungsverfahren und Anwendungsbereich unterschiedlich sein. Als besonders günstig für die meisten, interessierenden Analyten haben sich Sequenzen von ungefähr 40 Nukleotiden oder weniger erwiesen. Vorzugsweise werden Aptamere verwendet, die eine „Hairpin“-Struktur einnehmen und eine mehr oder weniger deutliche helikale Achse aufweisen. Die Bindungsstellen für die Zielmoleküle, d.h. Analyt oder Bindungsbereich der Detektionsstruktur, stehen vorzugsweise senkrecht zur helikalen Achse und liegen nicht im Krümmungsbereich des „Hairpins“. Bei einer anderen Ausführungsform kann auch die helikale Achse, z.B. durch Einbau ungepaarter Nukleinsäuren gekrümmt sein, so dass im Krümmungsbereich der „Hairpins“ liegende Bindungsstellen der Aptamere in der Reaktionseinheit benachbart angeordnet sind.

Günstigerweise sind die aptameren Funktionsköpfe der Reaktionseinheit kovalent miteinander verbunden. Dies kann beispielsweise durch chemische Synthese an einem Stück, durch enzymatische Verbindung (Ligation) mit einer DNA- oder RNA-Ligase oder durch chemische oder photoaktivierbare Koppler geschehen, die in einen aptameren Funktionskopf durch chemische Synthese eingebaut werden und dann zu einer chemischen Verbrückung mit einem anderen aptameren Funktionskopf führen. Bei einer bifunktionalen Reaktionseinheit sind die Aptamere vorzugsweise so angeordnet, dass ihre jeweiligen helikalen Achsen zu einer langen Achse kombiniert werden, d.h. im Wesentlichen miteinander fluchten.

Günstigerweise sind die Bindungsstellen an der Reaktionseinheit geometrisch so angeordnet, dass sie auf der gleichen Seite des helikalen Bereichs liegen. Auf diese Weise wird die gegenseitige Inhibition der Bindungen mit den Zielmolekülen erleichtert. Technisch lässt sich dies einfach erreichen, indem in einem empirischen Verfahren so viele Basenpaare einer inerten Sequenz, vorzugsweise mit der Grundstruktur $G(C)_1G(C)_2G(C)_3G(C)_4$ u.s.w., eingefügt werden, bis sich aufgrund sterischer Optimierung ein größtmöglicher Inhibitionseffekt ergibt. Je nach Ausführungsform können also die aptameren Funktionsköpfe direkt oder über eine Kopplungseinheit miteinander verbunden sein.

Bei einer besonders vorteilhaften Ausführungsform ist vorgesehen, dass das erste Aptamer und das zweite Aptamer derselben Reaktionseinheit einander bereichsweise überlappen. Das bedeutet, dass zwei aptamere Funktionsköpfe Bereiche ihrer Nukleotidsequenz gemeinsam haben. Es ist offensichtlich, dass bei einer solchen Ausführungsform der wechselseitige Inhibitionseffekt besonders groß ist. Selbstverständlich ist es jedoch auch möglich, dass das erste Aptamer und das zweite Aptamer derselben Reaktionseinheit räumlich getrennt sind.

Im Rahmen der vorliegenden Beschreibung ist der Begriff der „Detektionsstruktur“ weit zu verstehen und umfasst sowohl molekulare als auch apparative Strukturen. Nachfolgend sollen verschiedene, besonders günstige Ausführungsformen dargestellt werden.

Grundsätzlich ist es zwar möglich, das erfindungsgemäße Testsystem und -verfahren so zu konfigurieren, dass die Bindung des zweiten Aptamers an einen Bindungsbereich der

Detektionsstruktur das von der Detektionsstruktur abhängige Signal nicht beeinflusst. Beispielsweise könnte die Detektionsstruktur eine partikelförmige Direktmarkierung umfassen. Hierzu könnten etwa vorzugsweise biotinilierte Nanopartikel dienen, die an von dem zweiten Aptamer gebundenem Streptavidin haften.

In vielen Fällen günstiger ist es jedoch, wenn das Signal von einem Bindungszustand der Detektionsstruktur mit dem zweiten Aptamer abhängt. In diesem Fall nämlich können ansonsten erforderliche Reinigungsschritte zur Separation ungebundener Detektionsstrukturanteile entfallen.

Als besonders vorteilhaft hat sich erwiesen, wenn die Detektionsstruktur eine Spezies von mit Bindungsbereichen der Detektionsstruktur gekoppelten Enzymen umfasst, deren enzymatische Reaktion mit einer Spezies von Substraten eine Änderung einer detektierbaren Größe verursacht. Beispiele für einsetzbare Enzyme sind etwa Oxido-Reduktasen (z.B. Alkohol-Dehydrogenase, Glucose-Oxidase, Peroxidase, Luziferasse etc.), Transferasen (z.B. Hexokinase), Hydrolasen (z.B. Phosphatase, Urease, Lysozym, Nukleasen etc.), Lyasen (z.B. Dichlormethan-Dehalogenase etc.), Isomerasen (z.B. Retinalisomerase), Synthetasen (z.B. RNA-Ligase, DNA-Ligase etc.) etc.. Je nach Enzym/Substrat-System kann eine andere Größe als detektierbares Signal genutzt werden. Beispiele hierfür sind Farbänderungen, Extinktions- oder Transmissionsänderungen, Änderungen einer optischen Polarisierung, pH-Änderungen, Änderungen elektrischer Leitfähigkeit, Änderungen akustischer Leitfähigkeit etc..

Um eine besonders starke Abhängigkeit des detektierten Signals vom Bindungszustand der Detektionsstruktur mit dem

zweiten Aptamer zu erreichen, kann günstigerweise vorgesehen sein, dass ein Binden des zweiten Aptamers einer Reaktionseinheit mit einem Bindungsbereich die enzymatische Reaktion des mit diesem Bindungsbereich gekoppelten Enzyms mit dem Substrat inhibiert. Dies kann beispielsweise durch Umfaltung des Enzyms, initiiert durch die Bindung des Aptamers, oder, vorzugsweise, dadurch erreicht werden, dass der Bindungsbereich jeweils im Bereich des katalytischen Zentrums des Enzyms liegt und dieses durch das Binden des zweiten Aptamers blockiert wird.

Alternativ oder zusätzlich kann vorgesehen sein, dass die Detektionsstruktur eine Spezies von mit Bindungsbereichen der Detektionsstruktur gekoppelten, ersten fluoreszenzaktiven Komponenten umfasst. Als fluoreszenzaktiven Komponenten werden im Rahmen dieser Beschreibung jegliche Einheiten aufgefasst, die entweder selbst Fluorophore sind oder die Fluoreszenz anderer benachbarter Fluorophore beeinflussen können. Ist die erste fluoreszenzaktive Komponente ein Fluorophor, lassen sich Reaktionseinheiten, die mit ihrem zweiten Aptamer an die Detektionsstruktur gebunden haben, durch die Fluoreszenz dieses Fluorophors nachweisen.

In einer vorteilhaften Weiterbildung der Erfindung ist vorgesehen, dass die Reaktionseinheiten jeweils mit einer zweiten fluoreszenzaktiven Komponente versehen sind, die in Abhängigkeit von dem Bindungszustand des zweiten Aptamers mit einem Bindungsbereich der Detektionsstruktur mit der ersten fluoreszenzaktiven Komponente, die mit diesem Bindungsbereich gekoppelt ist, in optisch detektierbarer Weise wechselwirkt. Dies lässt sich insbesondere realisieren, wenn die miteinander wechselwirkenden ersten und zweiten fluoreszenzaktiven Komponenten jeweils einen Partner eines

FRET-Paare darstellen. Dabei wirkt einer der Partner als Donor, während der andere als Akzeptor oder Löscher (Quencher) wirkt. Aufgrund der starken Abstandsabhängigkeit (im Wesentlichen R^{-6} , wo R der Abstand der FRET-Partner ist) wird ein nennenswerter Energietransfer von Donor zu Akzeptor nur im Fall der Bindung des zweiten Aptamers an die Detektionsstruktur stattfinden. Die Effizienz des Transfers kann z.B. durch Beobachtung der Donor-Fluoreszenz, der Akzeptor-Fluoreszenz und / oder des Verhältnisses beider ermittelt werden.

Bei einer weiteren Ausführungsform der Erfindung umfasst die Detektionsstruktur eine flächen- und / oder massenbelegungsempfindliche Sensoranordnung. Dies ist eine Ausführungsform, bei dem die Detektionsstruktur eine apparative Struktur ist. Als flächen- und / oder massenbelegungsempfindliche Sensoranordnungen eignen sich beispielsweise Sensoreinheiten, die zu mechanischen Schwingungen anregbar sind und deren mechanische Impedanz durch Spektralanalyse der resultierenden mechanischen Schwingungen messbar ist. Die mechanische Impedanz ist abhängig von der Flächen- bzw. Massenbelegung. Derartige Sensoreinheiten sind sehr kleinformatig und in integrierter Schaltungsbauweise erhältlich.

Bei einer Ausführungsform ist dabei vorgesehen, dass die Sensoranordnung eine Mehrzahl von mit den zweiten Aptameren bindungsfähigen Bindungsbereichen aufweist. Dies bedeutet, dass Reaktionseinheiten, die nicht mit einem Analyten binden, direkt an die Sensorstruktur binden. In vielen Fällen ist jedoch vorteilhaft, die Reaktionseinheiten möglichst klein und damit mit geringer Masse auszubilden. Entsprechend sensitiv muss dann jedoch die Sensoreinheit ausgebildet sein.

Bei einer alternativen Weiterbildung der Erfindung ist daher vorgesehen, dass das Testsystem eine Spezies von Mittlereinheiten umfasst, die jeweils einen mit dem zweiten Aptamer bindungsfähigen Bindungsbereich aufweisen, wobei die Mittlereinheiten in Abhängigkeit von dem Bindungszustand ihrer Bindungsbereiche mit der Sensoreinheit koppelbar sind. Durch diese Mittlereinheiten, die beispielsweise als Proteine mit deutlich größerer Masse als die Reaktionseinheiten ausgebildet sein können, können die für den Nachweis wirksamen Massen erhöht werden, was einer Signalverstärkung und somit einer leichteren Detektion durch die Sensoreinheit entspricht.

Ausgehend von der hier offenbarten technischen Lehre, kann der Fachmann die Erfindung in einer Laborumgebung leicht umsetzen. Beim Einsatz außerhalb des Labors, beispielsweise bei Schwangerschaftstests für den Hausgebrauch, können jedoch zusätzliche Maßnahmen erforderlich werden. Für den Hausgebrauch bietet sich insbesondere ein sogenannter Streifentest an, bei dem die Detektion optisch, insbesondere im Rahmen einer Farbreaktion und besonders bevorzugt im Rahmen einer enzymvermittelten Farbreaktion erfolgt. Ein solches Testsystem zeichnet sich günstigerweise dadurch aus, dass die mit den Bindungsbereichen gekoppelten Enzyme sowie die oligofunktionalen Reaktionseinheiten in einer ersten Zone eines porösen Trägers enthalten sind, wobei wenigstens die oligofunktionalen Reaktionseinheiten in trockenem Zustand des porösen Trägers räumlich fixiert und nach Benetzung der ersten Zone mit der Testflüssigkeit wenigstens innerhalb der ersten Zone beweglich sind, so dass eine kompetitive Reaktion der oligofunktionalen Reaktionseinheiten mit den Analyten einerseits und den Bindungsbereichen andererseits erfolgen

kann, und wobei die Substrate in einer der ersten Zone benachbarten zweiten Zone enthalten und in trockenem Zustand des porösen Trägers in der zweiten Zone fixiert und nach Benetzung der zweiten Zone mit der Testflüssigkeit von der zweiten Zone in die erste Zone beweglich sind. In der Regel wird es nämlich günstig sein, wenn die Wechselwirkung zwischen Enzym und Substrat erst erfolgt, wenn die kompetitive Wechselwirkung zwischen erstem Aptamer und Analyt einerseits und zweitem Aptamer und dem mit dem Enzym gekoppelten Bindungsbereich andererseits abgeschlossen oder zumindest weit fortgeschritten ist. Dies gilt insbesondere für solche Fälle, in denen die enzymatische Reaktionsfähigkeit von dem Bindungszustand des Enzyms mit dem zweiten Aptamer abhängt. Liegen jedoch Enzym und Reaktionseinheit hinsichtlich ihrer Wechselwirkung in naher Nachbarschaft in einer ersten Zone vor, muss das Substrat erst zu dem Enzym wandern. Dadurch wird sichergestellt, dass die Enzym-Substrat-Reaktion zeitlich nach der Enzym-Reaktionseinheit-Reaktion erfolgt.

Um die zeitliche Trennung der Reaktionen weiter zu verbessern, ist bei einer Weiterbildung der Erfindung vorgesehen, dass die erste und die zweite Zone mittels einer semipermeablen Membran, die ein Übertreten der Enzyme von der ersten Zone in die zweite Zone verhindert und ein Übertreten der Substrate von der zweiten Zone in die erste Zone gestattet, voneinander getrennt sind. Auf diese Weise wird verhindert, dass die Zeit, die Enzym und Substrat benötigen, um zueinander zu finden, dadurch verkürzt wird, dass das Enzym dem Substrat „entgegenwandert“. Da Enzyme in der Regel deutlich größer sind als ihre korrespondierenden Substrate, stellt der Aufbau einer derartigen Membran für den Fachmann keine Schwierigkeit dar.

Alternativ oder zusätzlich kann vorgesehen sein, dass die Enzyme dauerhaft in der ersten Zone fixiert sind. Dies kann beispielsweise mittels einer Biotin / Streptavidin-Kopplung mit dem Material des porösen Trägers erfolgen.

Grundsätzlich ist es zwar möglich, die erste und zweite Zone auf dem Teststreifen nebeneinander anzuordnen. Insbesondere bei Verwendung einer semipermeablen Membran kann es jedoch günstiger sein, wenn die erste Zone und die zweite Zone in zwei übereinanderliegenden Schichten des porösen Trägers angeordnet sind.

Zur Umsetzung der Teststreifen-Variante der Erfindung ist es nicht erforderlich, dass die Enzyme und die Reaktionseinheiten in der ersten Zone durchmischt vorliegen. Vielmehr ist bei einer besonderen Ausführungsform vorgesehen, dass die erste Zone in wenigstens eine erste Teilzone, welche die Enzyme enthält und eine zweite Teilzone, welche die Reaktionseinheiten enthält, unterteilt ist. Insbesondere können die erste Teilzone und die zweite Teilzone in zwei übereinander liegenden Schichten des porösen Trägers angeordnet sein, wobei eine besonders günstige Schichtabfolge lautet: erste Teilzone, zweite Teilzone, optional semipermeable Membran, zweite Zone.

Weitere Merkmale und Vorteile der Erfindung ergeben sich der nachfolgenden, speziellen Beschreibung und den Zeichnungen.

Es zeigen:

Figur 1: eine schematische Prinzipskizze des erfindungsgemäßen Testsystems,

Figur 2: eine schematische Darstellung einer beispielhaften Reaktionseinheit,

Figur 3: eine schematische Darstellung einer weiteren beispielhaften Reaktionseinheit und

Figur 4: eine schematische Darstellung eines erfindungsgemäßen Streifentest.

Figur 1 zeigt eine schematische Darstellung des erfindungsgemäßen Testsystems. Kern des Testsystems sind Reaktionseinheiten 10, die jeweils zwei aptamere Funktionsköpfe 12 und 14 aufweisen. Die aptameren Funktionsköpfe 12 und 14 sind über eine Kopplungsstruktur 16 miteinander verbunden. Ein erstes Aptamer 12 ist derart selektiert oder synthetisiert, dass es selektiv und insbesondere spezifisch mit einem Analyten 18 binden kann. Das zweite Aptamer 14 ist derart selektiert oder synthetisiert, dass es mit dem katalytischen Zentrum 22 eines Enzyms 20 dauerhaft binden kann. Das bedeutet, durch Bindung des Aptamers 14 mit dem Enzym 20 wird dessen katalytisches Zentrum 22 blockiert.

Wie durch die Pfeile 24 und 26 angedeutet, werden in einem ersten Testschritt Reaktionseinheiten 10, Analyten 18 und Enzyme 20 gemischt. Dies erfolgt vorzugsweise in einer Testflüssigkeit, deren physikalische Eigenschaften, wie Temperatur, pH-Wert etc. geeignet gewählt sind, so dass die genannten und weitere physiologische Funktionen der beteiligten Reaktanden ablaufen können.

Einige der Reaktionseinheiten 10 binden mit ihrem ersten Aptamer 12 mit den Analyten 18 (Pfeil 28). Andere Reaktionseinheiten 10 binden mit ihrem zweiten Aptamer 14 mit den katalytischen Zentren 22 der Enzyme 20 (Pfeil 30). Eine simultane Bindung eines Analyten 18 und eines Enzyms 20 mit einer Reaktionseinheit 10 ist aufgrund der 3-dimensionalen Struktur der Reaktionseinheit 10 nicht möglich. Vielmehr inhibieren sich diese Reaktionen gegenseitig, so dass ein kompetitives Testprinzip vorliegt.

Nach Einstellung eines Gleichgewichts wird der Testflüssigkeit ein Substrat 32 zugegeben (Pfeil 34), welches unter zeitweiliger Bindung an das katalytische Zentrum 22 des Enzyms 20 eine enzymatische Reaktion durchläuft (symbolisiert durch Reaktionspfeil 36). Im Rahmen der enzymatischen Reaktion wird das Substrat 32 von dem Enzym 20 verändert, was zu einem detektierbaren Signal, beispielsweise eine Farbänderung, eine pH-Änderung, eine Änderung einer optischen Polarisation etc., führen kann. Die Stärke der enzymatischen Reaktion und damit die Stärke des Signals ist bei standardisierten Testbedingungen abhängig von der Menge des zur Verfügung stehenden, ungebundenen Enzyms 20 (Pfeil 38) und damit indirekt von der Menge des Analyten 18. Im Gegensatz zu einem Direkttest hat ein derartiger, kompetitiver Test den Vorteil, dass durch geeignete Wahl der Mengen bzw. Konzentrationen von Reaktionseinheiten 10, Enzymen 20 und Substraten 32 in Abstimmung auf die erwartete Menge bzw. Konzentration an Analyten 18 eine Signalstärke erzeugt werden kann, die für die jeweilige Testapparatur, beispielsweise eine Extinktions-Messvorrichtung, optimiert ist.

Figur 2 zeigt in schematischer Darstellung einen beispielhaften Aufbau einer Reaktionseinheit 10. Die Aptamere 12 und 14 bestehen jeweils aus einem sogenannten „Hairpin“ mit einer Krümmung 122, 142 aus ungepaarten Nukleinsäuren und einem helikalen Bereich 124, 144 aus gepaarten Nukleinsäuren. Die Aptamere 12 und 14 sind jeweils so selektiert bzw. synthetisiert, dass sie mit ihren jeweiligen Zielmolekülen (Analyt 18 bzw. Enzym 20) bindungsfähig und vorzugsweise selektiv, insbesondere spezifisch sind. In der beispielhaften Darstellung von Figur 2 zeigt das Aptamer 14 eine weitere Schleife 146, um einen Unterschied der 3-dimensionalen Struktur des Aptamers 14 gegenüber dem Aptamer 12 zu symbolisieren.

Die Aptamere 12 und 14 sind mittels einer nicht näher dargestellten Kopplungsstruktur 16 miteinander verbunden. Die Kopplungsstruktur 16 kann ebenfalls als geeignete Oligonukleotidstruktur ausgebildet sein, wobei die genaue Struktur und Sequenz sowie das Verbindungsverfahren anwendungsbezogen vom Fachmann geeignet zu wählen ist.

Figur 3 stellt schematisch eine weitere Ausführungsform einer Reaktionseinheit 10 mit zwei Aptameren 12 und 14 dar. Wie auch bei dem Ausführungsbeispiel von Figur 2 weisen die Aptamere 12 und 14 jeweils einen „Hairpin“ 122, 142 auf, sind jedoch mit ihren helikalen Bereichen 124, 144 so miteinander verbunden, dass ihre helikalen Achsen im Wesentlichen miteinander fluchten. Bei dem Ausführungsbeispiel von Figur 3 weisen beide Aptamere 12 und 14 jeweils eine weitere Schleife 126, 146 auf, die für ihre Bindung mit dem jeweiligen Zielmolekül verantwortlich ist. Die helikalen Bereiche 124, 144 sind so gewählt, dass die zusätzlichen Schleifen 126, 146 auf der gleichen Seite (oben in Figur 3) der

Reaktionsstruktur 10 liegen. Gegebenenfalls können zusätzliche Nukleinsäure-Paare eingebaut werden, um die Helixstruktur so zu erweitern, dass die in Figur 3 dargestellte Ausrichtung zustande kommt.

Figur 4 zeigt schematisch den Aufbau eines sogenannten Streifentest, der das erfindungsgemäße Testprinzip verwirklicht. Reaktionseinheiten 10, Analyten 18, Enzyme 20 und Substrate 32 sind wie in Figur 1 dargestellt. Der Streifentest von Figur 4 weist zwei übereinanderliegende Schichten porösen Trägermaterials, beispielsweise Nitrocellulose, auf. In einer oberen Schicht 50 sind Reaktionseinheiten 10 und Enzyme 20 in einer Weise aufgebracht, dass sie im trockenen Zustand des Trägermaterials immobilisiert sind, während sie sich in feuchtem Zustand des Trägermaterials in diesem bewegen und insbesondere miteinander reagieren können. In der unteren Schicht 52 des Trägermaterials ist eine Substratspezies 32 in gleicher Weise angeordnet. Alternativ zu der in Figur 4 dargestellten Anordnung können Reaktionseinheiten 10 und Enzyme 20 auch in unterschiedlichen Teilbereichen der oberen Schicht 50 angeordnet sein.

Die Schichten 50 und 52 sind durch eine semipermeable Membran 54 voneinander getrennt. Die Poren dieser Membran 54 gestatten es dem Substrat 32, in feuchtem Zustand des Trägers aus der unteren Schicht 52 in die obere Schicht 50 zu diffundieren. Eine Diffusion des Enzyms 20 von der oberen Schicht 50 in die untere Schicht 52 wird hingegen von der Membran 54 unterbunden.

Teilfigur 4a zeigt den beschriebenen Ausgangszustand bei trockenem Träger. Teilfigur 4b symbolisiert die Zugabe von

Analyten 18 enthaltender Testflüssigkeit 58 (Pfeil 60). In dem durch die Testflüssigkeit 58 befeuchteten Träger beginnen die Reaktanden aufgrund der wirkenden Kapillarkräfte mit der Flüssigkeit in dem Träger zu wandern. Dabei kommt es zu der im Zusammenhang mit Figur 1 bereits beschriebenen kompetitiven Reaktion zwischen Reaktionseinheiten 10 und Analyten 18 einerseits und Reaktionseinheiten 10 und Enzymen 20 andererseits (Teilfigur 4c). Diese kompetitive Reaktion wird zunächst nicht durch Bindung von Substraten 32 an die Enzyme 20 gestört, da diese räumlich abseits in der unteren Schicht 52 vorliegen und erst durch die Membran 54 in die obere Schicht 50 eindiffundieren müssen. Sie erreichen die ungebundenen Enzyme 20 erst zu einem Zeitpunkt, zu dem die kompetitive Reaktion bereits ein Gleichgewicht gefunden hat oder zumindest bis zu einem definierten Grad fortgeschritten ist.

Figur 4d deutet den letzten Testschritt an, bei dem die Substrate 32 mit den Enzymen 20 reagieren und das detektierbare Signal erzeugen.

Natürlich stellen die beschriebenen und durch die Figuren illustrierten Ausführungsbeispiele lediglich besonders vorteilhafte, exemplarische Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung dar. Insbesondere in Bezug auf den konkreten Detektionsvorgang und Detektionsapparatur steht dem Fachmann ein breites Spektrum an Möglichkeiten offen, wie dies im allgemeinen Teil der Beschreibung angedeutet wurde.

Patentansprüche

1. Aptamerbasiertes Testsystem zum Nachweis einer Spezies von Analyten (18) in einer Testflüssigkeit (58) unter Detektion eines von einer Detektionsstruktur (20) abhängigen Signals, umfassend eine Spezies oligofunktionaler Reaktionseinheiten (10), die jeweils wenigstens ein mit einem Analyten (18) bindungsfähiges, erstes Aptamer (12) und wenigstens ein mit dem ersten Aptamer (12) verknüpftes und mit Bindungsbereichen (22) der Detektionsstruktur (20) bindungsfähiges, zweites Aptamer (14) aufweisen, wobei das erste Aptamer (12) und das zweite Aptamer (14) jeder Reaktionseinheit (10) derart miteinander verknüpft sind, dass ein Binden des ersten Aptamers (12) einer Reaktionseinheit (10) mit einem Analyten (18) ein simultanes Binden des zweiten Aptamers (14) derselben Reaktionseinheit (10) mit einem Bindungsbereich (22) der Detektionsstruktur (20) inhibiert **dadurch gekennzeichnet,** dass das erste Aptamer (12) und das zweite Aptamer (14) jeder Reaktionseinheit (10) weiter derart miteinander verknüpft sind, dass ein Binden des zweiten Aptamers (14) einer Reaktionseinheit (10) mit einem Bindungsbereich (22) der Detektionsstruktur (20) ein simultanes Binden des ersten Aptamers (12) derselben Reaktionseinheit (10) mit einem Analyten (18) inhibiert.

2. Testsystem nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
dass das Binden des ersten Aptamers (12) mit dem Analyten (18) und / oder das Binden des zweiten Aptamers (14) mit dem Bindungsbereich (22) der Detektionsstruktur (20) selektiv, insbesondere spezifisch ist.
3. Testsystem nach einem der vorangehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
dass wenigstens ein Aptamer (12; 14) einer Reaktionseinheit (19) eine Hairpin-Struktur (122; 142) und einen helikalen Bereich (124; 144) aufweist.
4. Testsystem nach Anspruch 3,
dadurch gekennzeichnet,
dass das Aptamer (12; 14) beim Binden mit einem Bindungspartner (18; 20) in einem Bereich (126; 146) bindet, der senkrecht zur Längsachse des helikalen Bereichs (124; 144) steht und nicht im Bereich der Krümmung (122; 142) der Hairpin-Struktur liegt.
5. Testsystem nach einem der vorangehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
dass diejenigen Bereiche (126; 146) des ersten und des zweiten Aptamers (12; 14) einer Reaktionseinheit (10), mit denen diese mit ihren jeweiligen Bindungspartnern (18; 20) binden können, auf derselben Seite der Reaktionseinheit (10) liegen.

6. Testsystem nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Signal von einem Bindungszustand der Detektionsstruktur (20) mit dem zweiten Aptamer (14) abhängt.
7. Testsystem nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das erste Aptamer (12) und das zweite Aptamer (14) derselben Reaktionseinheit (10) einander bereichsweise überlappen.
8. Testsystem nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass das erste Aptamer (12) und das zweite Aptamer (14) derselben Reaktionseinheit (10) räumlich getrennt angeordnet sind.
9. Testsystem nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das erste Aptamer (12) und das zweite Aptamer (14) derselben Reaktionseinheit (10) mittels einer Kopplungsstruktur (16) miteinander verbunden sind.
10. Testsystem nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Kopplungsstruktur (16) eine Oligonukleotidstruktur umfasst.
11. Testsystem nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Detektionsstruktur eine Spezies von mit Bindungsbereichen der Detektionsstruktur gekoppelten

Enzymen (20) umfasst, deren enzymatische Reaktion mit einer Spezies von Substraten (32) eine Änderung einer detektierbaren Größe verursacht.

12. Testsystem nach Anspruch 11,
dadurch gekennzeichnet,
dass ein Binden des zweiten Aptamers (14) einer Reaktionseinheit (10) mit einem Bindungsbereich (22) der Detektionsstruktur die enzymatische Reaktion des mit diesem Bindungsbereich (22) gekoppelten Enzyms (20) mit dem Substrat (32) inhibiert.
13. Testsystem nach Anspruch 12,
dadurch gekennzeichnet,
dass der Bindungsbereich jeweils im Bereich des katalytischen Zentrums (22) des Enzyms (20) liegt und dieses durch das Binden des zweiten Aptamers (14) blockiert wird.
14. Testsystem nach einem der Ansprüche 11 bis 13,
dadurch gekennzeichnet,
dass die mit den Bindungsbereichen (22) gekoppelten Enzyme (20) sowie die oligofunktionalen Reaktionseinheiten (10) in einer ersten Zone (50) eines porösen Trägers enthalten sind, wobei wenigstens die oligofunktionalen Reaktionseinheiten (10) in trockenem Zustand des porösen Trägers räumlich fixiert und nach Benetzung der ersten Zone (50) mit der Testflüssigkeit (58) wenigstens innerhalb der ersten Zone (50) beweglich sind, so dass eine kompetitive Reaktion der oligofunktionalen Reaktionseinheiten (10) mit den Analyten (18) einerseits und den Bindungsbereichen (22) andererseits erfolgen kann, und wobei die Substrate (32)

in einer der ersten Zone (50) benachbarten zweiten Zone (52) enthalten und in trockenem Zustand des porösen Trägers in der zweiten Zone (52) fixiert und nach Benetzung der zweiten Zone (52) mit der Testflüssigkeit (58) von der zweiten Zone (52) in die erste Zone (50) beweglich sind.

15. Testsystem nach Anspruch 14,
dadurch gekennzeichnet,
dass die erste und die zweite Zone (50; 52) mittels einer semipermeablen Membran (54), die ein Übertreten der Enzyme (20) von der ersten Zone (50) in die zweite Zone (52) verhindert und ein Übertreten der Substrate (32) von der zweiten Zone (52) in die erste Zone (50) gestattet, voneinander getrennt sind.
16. Testsystem nach einem der Ansprüche 14 oder 15,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Enzyme (20) dauerhaft in der ersten Zone (50) fixiert sind.
17. Testsystem nach einem der Ansprüche 14 bis 16,
dadurch gekennzeichnet,
dass die erste Zone und die zweite Zone in zwei übereinanderliegenden Schichten (50; 52) des porösen Trägers angeordnet sind.
18. Testsystem nach einem der Ansprüche 14 bis 17,
dadurch gekennzeichnet,
dass die erste Zone in wenigstens eine erste Teilzone, welche die Enzyme enthält, und eine zweite Teilzone, welche die Reaktionseinheiten enthält, unterteilt ist.

19. Testsystem nach Anspruch 18,
dadurch gekennzeichnet,
dass die erste Teilzone und die zweite Teilzone in zwei
übereinanderliegenden Schichten des porösen Trägers
angeordnet sind.
20. Testsystem nach einem der vorangehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Detektionsstruktur eine Spezies von mit
Bindungsbereichen der Detektionsstruktur gekoppelten,
ersten fluoreszenzaktiven Komponenten umfasst.
21. Testsystem nach Anspruch 20,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Reaktionseinheiten jeweils mit einer zweiten
fluoreszenzaktiven Komponente versehen sind, die in
Abhängigkeit von dem Bindungszustand des zweiten Aptamers
mit einem Bindungsbereich der Detektionsstruktur mit der
ersten fluoreszenzaktiven Komponente, die mit dem
Bindungsbereich gekoppelt ist, in optisch detektierbarer
Weise wechselwirkt.
22. Testsystem nach Anspruch 21,
dadurch gekennzeichnet,
dass die miteinander wechselwirkenden ersten und zweiten
fluoreszenzaktiven Komponenten jeweils einen Partner
eines FRET-Paares darstellen.
23. Testsystem nach einem der vorangehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Detektionsstruktur eine partikelförmige
Direktmarkierung umfasst.

24. Testsystem nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Detektionsstruktur eine flächen- und /oder massenbelegungsempfindliche Sensoranordnung umfasst.
25. Testsystem nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, dass die Sensoreinheit zu mechanischen Schwingungen anregbar und ihre mechanische Impedanz durch Spektralanalyse der resultierenden mechanischen Schwingungen messbar ist.
26. Testsystem nach einem der Ansprüche 24 oder 25, dadurch gekennzeichnet, dass die Sensoranordnung eine Mehrzahl von mit den zweiten Aptameren bindungsfähigen Bindungsbereichen aufweist.
27. Testsystem nach einem der Ansprüche 24 oder 25, dadurch gekennzeichnet, eine Spezies von Mittlereinheiten vorgesehen ist, die jeweils einen mit dem zweiten Aptamer bindungsfähigen Bindungsbereich aufweisen, wobei die Mittlereinheiten in Abhängigkeit von dem Bindungszustand ihrer Bindungsbereiche mit der Sensoreinheit koppelbar sind.
28. Testverfahren zum Nachweis einer Spezies von Analyten (18) in einer Testflüssigkeit (58) unter Detektion eines von einer Detektionsstruktur (20) abhängigen Signals, wobei eine Spezies oligofunktionaler Reaktionseinheiten (10), die jeweils wenigstens ein mit einem Analyten (18) bindungsfähiges, erstes Aptamer (12) und wenigstens ein mit dem ersten Aptamer (12) verknüpftes und mit

Bindungsbereichen (22) der Detektionsstruktur (20) bindungsfähiges, zweites Aptamer (14) aufweisen, über Bindungen erster Aptamere (12) mit Analyten (18) und über Bindungen zweiter Aptamere (14) mit Bindungsbereichen (22) der Detektionsstruktur (20) binden, wobei das erste Aptamer (12) und das zweite Aptamer (14) jeder Reaktionseinheit (10) derart miteinander verknüpft sind, dass ein Binden des ersten Aptamers (12) einer Reaktionseinheit (10) mit einem Analyten (18) ein simultanes Binden des zweiten Aptamers (14) derselben Reaktionseinheit (10) mit einem Bindungsbereich (22) der Detektionsstruktur (20) inhibiert

dadurch gekennzeichnet,

dass das erste Aptamer (12) und das zweite Aptamer (14) jeder Reaktionseinheit (10) weiter derart miteinander verknüpft sind, dass ein Binden des zweiten Aptamers (14) einer Reaktionseinheit (10) mit einem Bindungsbereich (22) der Detektionsstruktur (20) ein simultanes Binden des ersten Aptamers (12) derselben Reaktionseinheit (10) mit einem Analyten (18) inhibiert.

1/2

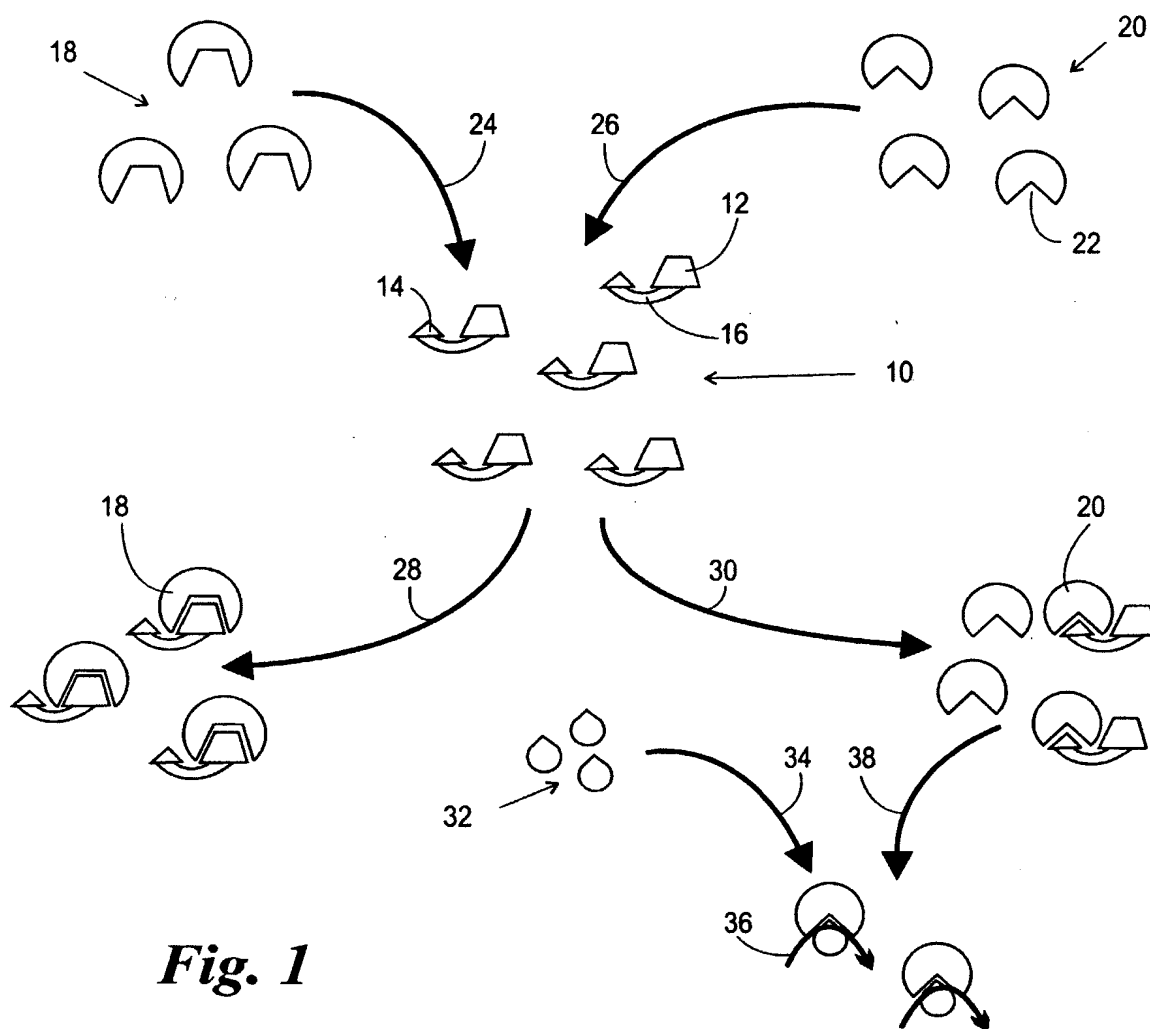


Fig. 1

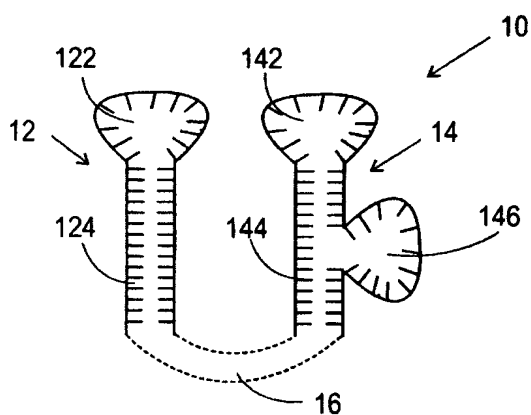


Fig. 2

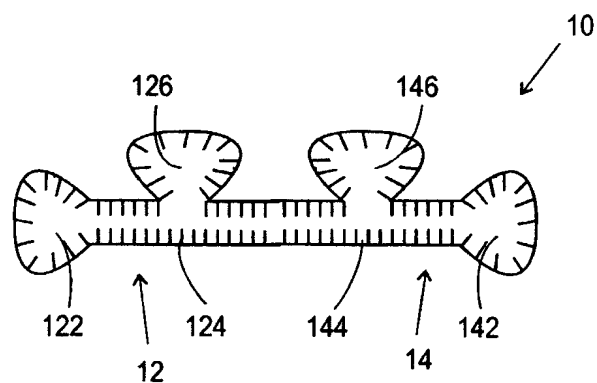
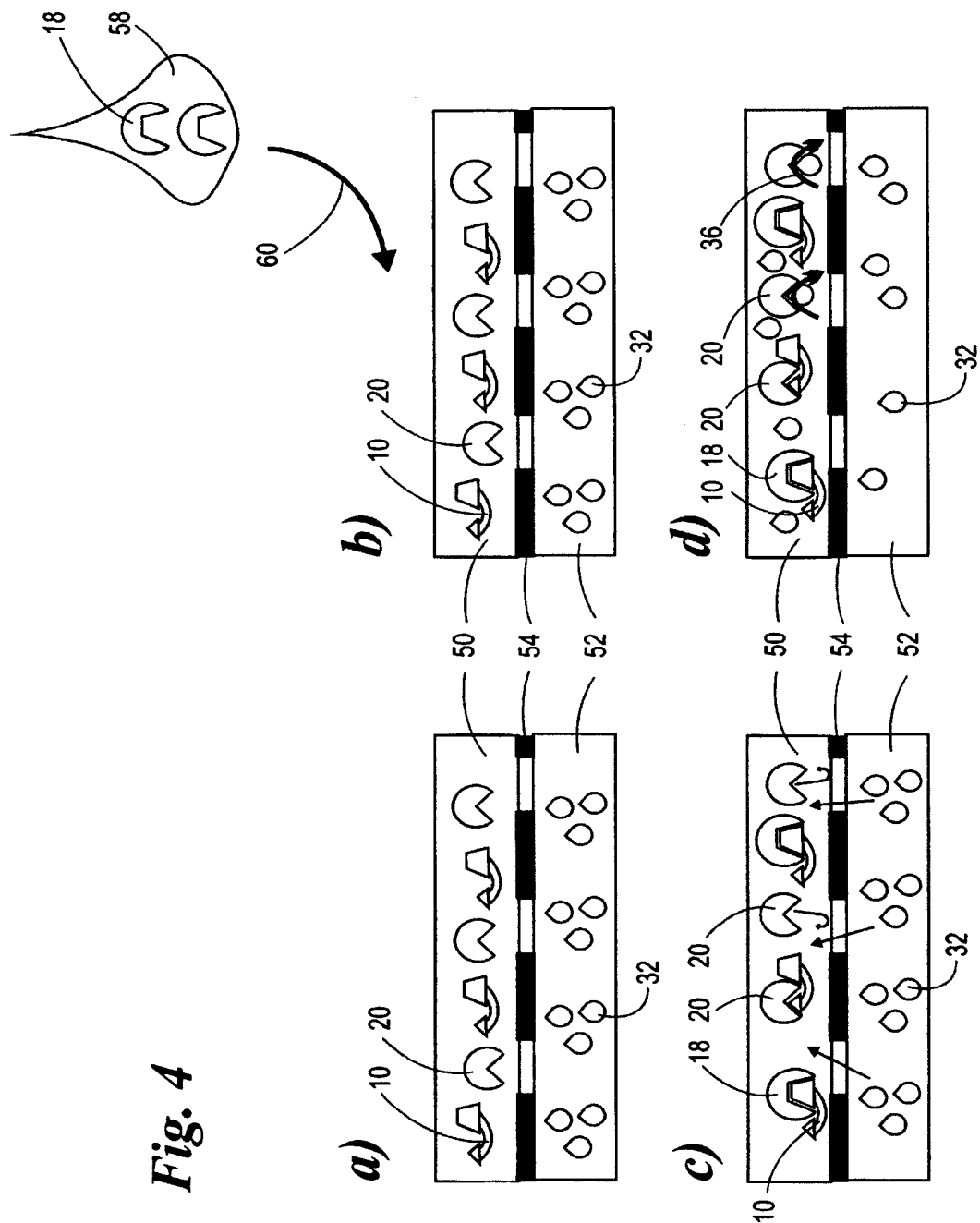


Fig. 3

Fig. 4



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2005/011477

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12Q1/68 G01N33/542		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12Q G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE, INSPEC, COMPENDEX		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2004/053271 A1 (DROLET DANIEL ET AL) 18 March 2004 (2004-03-18)	1,2,6,8, 11,12,28
Y	paragraph '0055!; claims 1-6 -----	1-28
X	US 2003/162216 A1 (GOLD LARRY ET AL) 28 August 2003 (2003-08-28)	1-3,6, 23,28
Y	paragraphs '0080! - '0082!; figures 1,4,5 -----	1-28
X	WU LIHONG ET AL: "An allosteric synthetic DNA" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 27, no. 6, 15 March 1999 (1999-03-15), pages 1512-1516, XP002364231 ISSN: 0305-1048	1,2,6,7
Y	the whole document ----- -/--	1-28
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : * A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance * E* earlier document but published on or after the international filing date * L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) * O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means * P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed * T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention * X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone * Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. * &* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 25 January 2006		Date of mailing of the international search report 10/02/2006
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Weber, P

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2005/011477

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>LUZI E ET AL: "New trends in affinity sensing - aptamers for ligand binding" TRAC, TRENDS IN ANALYTICAL CHEMISTRY, ANALYTICAL CHEMISTRY. CAMBRIDGE, GB, vol. 22, no. 11, December 2003 (2003-12), pages 810-818, XP004566130 ISSN: 0165-9936 the whole document</p>	1-28
A	<p>WO 02/061079 A (ISIS INNOVATION LIMITED; TAHIRI-ALAOUI, ABDESSAMAD; JAMES, WILLIAM, S) 8 August 2002 (2002-08-08) cited in the application the whole document</p>	1-28
A	<p>BURKE DONALD ET AL: "Recombination, RNA evolution, and bifunctional RNA molecules isolated through chimeric SELEX" RNA (NEW YORK), vol. 4, no. 9, September 1998 (1998-09), pages 1165-1175, XP002364232 ISSN: 1355-8382 the whole document</p>	1-28

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2005/011477

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2004053271	A1	18-03-2004	NONE	
US 2003162216	A1	28-08-2003	NONE	
WO 02061079	A	08-08-2002	WO 02061125 A2	08-08-2002

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2005/011477

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
C12Q1/68 G01N33/542

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
C12Q G01N

Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE, INSPEC, COMPENDEX

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 2004/053271 A1 (DROLET DANIEL ET AL) 18. März 2004 (2004-03-18)	1,2,6,8, 11,12,28
Y	Absatz '0055!; Ansprüche 1-6 -----	1-28
X	US 2003/162216 A1 (GOLD LARRY ET AL) 28. August 2003 (2003-08-28)	1-3,6, 23,28
Y	Absätze '0080! - '0082!; Abbildungen 1,4,5 -----	1-28
X	WU LIHONG ET AL: "An allosteric synthetic DNA" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, Bd. 27, Nr. 6, 15. März 1999 (1999-03-15), Seiten 1512-1516, XP002364231 ISSN: 0305-1048	1,2,6,7
Y	das ganze Dokument ----- -/--	1-28

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen ☒ Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
 - *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
 - *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
 - *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
 - *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
 - *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
 - *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
 - *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
 - *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
 - *Z* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

25. Januar 2006

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

10/02/2006

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Weber, P

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	LUZI E ET AL: "New trends in affinity sensing - aptamers for ligand binding" TRAC, TRENDS IN ANALYTICAL CHEMISTRY, ANALYTICAL CHEMISTRY. CAMBRIDGE, GB, Bd. 22, Nr. 11, Dezember 2003 (2003-12), Seiten 810-818, XP004566130 ISSN: 0165-9936 das ganze Dokument -----	1-28
A	WO 02/061079 A (ISIS INNOVATION LIMITED; TAHIRI-ALAOUI, ABDESSAMAD; JAMES, WILLIAM, S) 8. August 2002 (2002-08-08) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument -----	1-28
A	BURKE DONALD ET AL: "Recombination, RNA evolution, and bifunctional RNA molecules isolated through chimeric SELEX" RNA (NEW YORK), Bd. 4, Nr. 9, September 1998 (1998-09), Seiten 1165-1175, XP002364232 ISSN: 1355-8382 das ganze Dokument -----	1-28

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2005/011477

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
US 2004053271	A1	18-03-2004	KEINE		
US 2003162216	A1	28-08-2003	KEINE		
WO 02061079	A	08-08-2002	WO	02061125 A2	08-08-2002